

Teil II
Synthese / Analytik

Kapitel 5

Synthesen

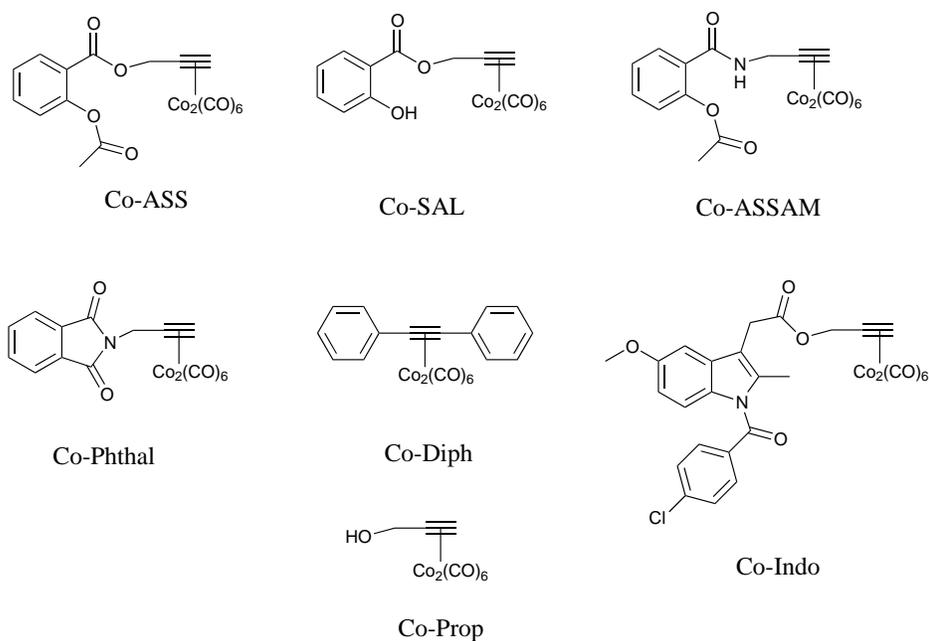


Abbildung 5.1: Cobalt-Alkin-Komplexe: Strukturen

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Cobalt-Alkin-Komplexe sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Da die präparative Herstellung der meisten Verbindungen schon in der Literatur beschrieben ist, wurde auf eine nähere Beschreibung verzichtet. In einem ersten Schritt wurden die Alkinliganden, sofern nicht im Handel erhältlich, synthetisiert und im zweiten Schritt mit Dicobaltoctacarbonyl zu den Komplexen umgesetzt. Die detaillierten Synthesevorschriften und analytischen Daten finden sich in Abschnitt 17.2.

5.1 Synthese der Alkinliganden

2-Acetoxy-propargylbenzoat

2-Acetoxybenzoesäure wurde mit einem Überschuß von Propargylalkohol unter Zusatz von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und einer katalytischen Menge 4-Dimethylaminopyridins (DMAP) in Dichlormethan bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff (DCH) wurde abfiltriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Reaktionsprodukt wurde aus dem Filtrat isoliert und durch Säulenchromatographie gereinigt. Der Mechanismus dieser Reaktion wurde von Hassner beschrieben (siehe Abbildung 5.2a und [74]): Die Säure (I) wird durch Reaktion mit DCC in das entsprechende Anhydrid (II) überführt. Dieses reagiert mit DMAP (III) zu einem Äquivalent des entsprechenden N-Acylpyridiniumderivats (V) und einem Äquivalent des entsprechenden Carboxylats (IV). Die N-Acylgruppe des N-Acylpyridiniumderivats wird von dem eingesetzten Alkohol nukleophil angegriffen, wodurch ein Äquivalent der eingesetzten Säure (I) und der Katalysator (III) regeneriert werden und ein Äquivalent des gewünschten Esters (VI) gebildet wird. Der Vorteil dieser Reaktion gegenüber anderen Estersynthesen liegt darin, dass die Bedingungen sehr schonend sind. Eine detaillierte Versuchsvorschrift mit den spektroskopischen Daten findet sich in Abschnitt 17.2.1. [42]

2-Hydroxy-propargylbenzoat

Natriumsalicylat wird mit einem Überschuß Propargylbromid in Aceton unter Rückfluß erhitzt. Das entstandene Natriumbromid wird abfiltriert, die vereinigten Filtrate zur Trockne eingeeengt und das Produkt durch Säulenchromatographie isoliert (siehe Abbildung 5.2b). Eine detaillierte Versuchsvorschrift mit den spektroskopischen Daten findet sich in Abschnitt 17.2.1. [41]

2-Acetoxy-N-propargylbenzamid

Die Synthese des 2-Acetoxy-N-propargylbenzamids erfolgte wie in der Literatur beschrieben (siehe Abbildung 5.2c) [75]. Hierbei wird Acetylsalicylsäurechlorid mit einem Überschuß Propargylamin in eisgekühltem Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Nach kurzer Reaktionszeit (30 Minuten) wird der Ansatz durch Filtration von unlöslichen Bestandteilen gereinigt und eingeeengt. Das 2-Acetoxy-N-propargylbenzamid wird nach Aufkochen mit Cyclohexan, Abdekantieren und Auskristallisation im Kühlschrank als Rohprodukt gewonnen. Eine detaillierte Versuchsvorschrift mit den spektroskopischen Daten findet sich in Abschnitt 17.2.1.

N-Propargylphthalimid

Kaliumphthalimid wurde mit einem Überschuß Propargylbromid in Aceton unter Rückfluß erhitzt (siehe Abbildung 5.2d). Das entstandene Kaliumbromid wurde durch Filtration entfernt, die vereinigten Filtrate zur Trockne eingengt und das Produkt durch Umkristallisation gereinigt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde weiter umgesetzt. Eine detaillierte Versuchsvorschrift mit den spektroskopischen Daten findet sich in Abschnitt 17.2.1.[76]

(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolyl-essigsäurepropargylester

Indomethacin wird in Aceton mit einem Überschuß an Propargylbromid unter basischen Bedingungen (Triethylamin) zur Reaktion gebracht (siehe Abbildung 5.2e). Die Aufreinigung erfolgt durch Filtration und Säulenchromatographie. Die Verbindung wurde als Rohprodukt weiter umgesetzt. Eine detaillierte Versuchsvorschrift mit den spektroskopischen Daten findet sich in Abschnitt 17.2.1. [77]

5.2 Synthese der Cobalt-Alkin-Komplexe

Die Alkinderivate werden in Diethylether gelöst und mit einem Überschuß an Dicobaltoctacarbonyl versetzt und bei Raumtemperatur gerührt (siehe Abbildung 5.2f). Die Reaktion kann durch das Entweichen von CO aus der Reaktionsmischung direkt beobachtet werden. Nach 1-2 Stunden wird der Ansatz mit ca. 1g Kieselgel versetzt und das Lösungsmittel entfernt. Die stark gefärbten Produkte werden durch Säulenchromatographie gereinigt. Eine detaillierte Versuchsvorschrift mit den spektroskopischen Daten findet sich in Abschnitt 17.2.2. [42, 43]

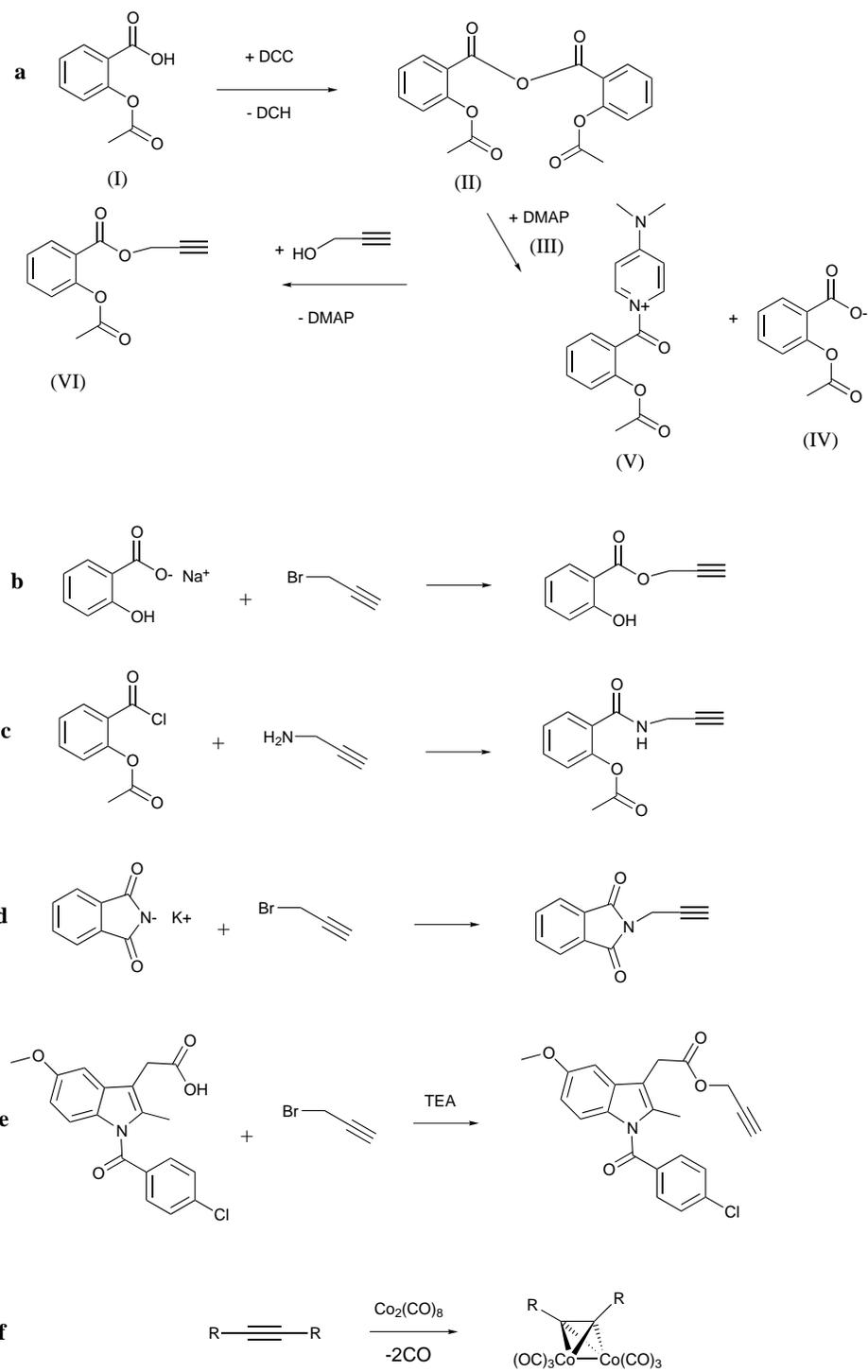


Abbildung 5.2: Synthesen der Alkinliganden (a-e) und Synthese der Komplexe (f)

Kapitel 6

Analytik

Zur Strukturaufklärung der Komplexe und ihrer Vorstufen wurden Infrarotspektroskopie, Massenspektroskopie und Kernresonanzspektroskopie angewandt. Die spektroskopischen Daten der einzelnen Verbindungen finden sich in Abschnitt 17.2. Die Reinheitsprüfung erfolgte bei den zur biologischen Testung herangezogenen Verbindungen durch Elementaranalyse und HPLC.

6.1 Infrarotspektroskopie

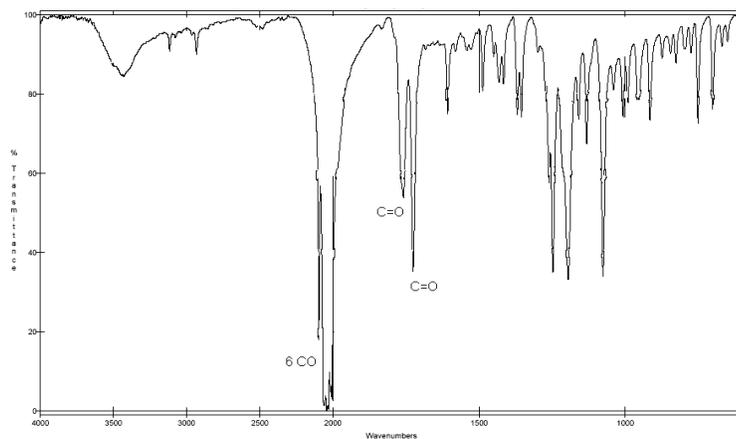


Abbildung 6.1: IR-Spektrum von Co-ASS. CO: Kohlenmonoxidbanden; C=O: Esterbanden

Die Infrarotspektroskopie liefert wertvolle Hinweise über den Ablauf der Komplexierungsreaktion der Alkine an Dicobaltoctacarbonyl. Das Edukt Dicobaltoctacarbonyl weist acht Carbonylgruppen auf. Davon werden zwei zur Verbrückung der beiden Cobaltatome gebraucht, die übrigen sechs sind terminal angeordnet. Im IR-Spektrum können die Valenzschwingungen der Brücken-carbonyle (zwei Banden bei 1832 und 1846 cm^{-1}) leicht von denen der terminalen Carbonyle (sechs Banden zwischen 2000 und 2100 cm^{-1}) unterschieden werden. Bei der Komplexierung an die Alkine gehen die zwei Banden bei 1832 und 1846 cm^{-1} verloren (siehe Abbildung 6.1). Dies ist ein Hinweis dafür, dass in den Komplexen alle Carbonyle terminal angeordnet sind.

In den IR-Spektren der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Komplexe sind die Banden für die Valenzschwingungen der Carbonyle oft sehr schlecht aufgelöst. Meist sind nur 1-4 Banden zu erkennen. Der Einfluß der einzelnen Alkinliganden auf die Lage der CO-Signale ist vernachlässigbar klein. Die mit der Komplexierung einhergehende Verringerung des Dreifachbindungscharakters der Alkine läßt sich in den IR-Spektren gut erkennen. Die Banden der CH-Valenzschwingung (im Bereich 3200-3300 cm^{-1}) und der C-C-Valenzschwingung (bei ca. 2110 cm^{-1}) der freien Liganden gehen durch die Koordination an $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ verloren (siehe Abbildung 6.1). [42, 43]

6.2 Massenspektroskopie

Die Massenspektren (EI) der Komplexe weisen oft keinen Molpeak auf. Die Signale mit den höchsten Massen entsprechen aber dem Molpeak abzüglich der Massen der einzelnen Carbonyle. D.h. die Signale der größten Massen verringern sich schrittweise immer um $m/z=28$ [42].

6.3 NMR-Spektroskopie

Durch die Koordination an Cobalt werden die Signale der Alkine charakteristisch verändert. In den ^1H -NMR Spektren erscheinen die Resonanzen der an beiden Enden der Dreifachbindung folgenden Protonen der freien Liganden bei 2.23-2.55ppm (CH) und 4.23-4.95ppm (CH_2) und sind durch 'long range'-Kopplungen ($J=2.5$ -2.6Hz) aufgespalten. In den Komplexen sind die entsprechenden Signale tieffeldverschoben (CH: 5.92-6.16ppm, CH_2 : 4.78-5.56ppm) und erscheinen als breite Singulets. (siehe Abbildung 6.2, Tabelle 6.1 und Abschnitt 5.2) Diese Ergebnisse deuten eine Reduktion des Dreifachbindungscharakters in Richtung eines Z-Olefins an. [42, 43]

Interessanterweise wirken sich die erwähnten Effekte bei Esterderivaten (Co-

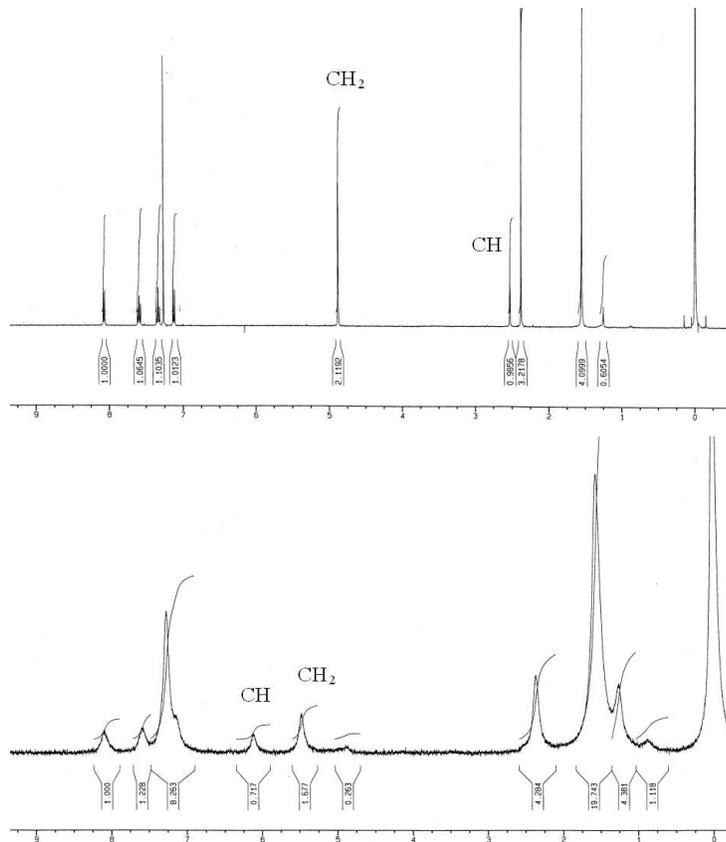


Abbildung 6.2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des freien Alkinliganden Prop-ASS (oben) und des Komplexes Co-ASS (unten)

ASS, Co-SAL und Co-Indo) und Amidderivaten (Co-ASSAM und Co-Phthal) tendenziell etwas unterschiedlich aus: Das CH-Proton ist bei den Estern um 3.45-3.61ppm und den Amiden um 3.81-3.85ppm verschoben. Die CH₂-Protonen der Ester sind um 0.61-0.62ppm und die der Amide um 0.55-0.58ppm versetzt. Die Tieffeldverschiebung ist also bei den Amiden bei den Methinprotonen stärker und bei den Methylenprotonen schwächer ausgeprägt.

In den ^{13}C -Spektren wirkt sich die Koordination an $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ ebenfalls deutlich aus. Dabei wird vor allem der CH₂-Kohlenstoff entschirmt und somit tieffeldverschoben. Das bedeutet die Dreifachbindung ist im koordinierten Zustand stärker polarisiert als im freien Zustand [42, 43, 78]. So erscheint z.B. die CH₂-Gruppe von 2-Acetoxy-propargylbenzoat bei 52.7ppm, während sie im entsprechenden Komplex zu 65.5ppm tieffeldverschoben ist.

	freier Ligand	Komplex	Verschiebung
	CH / CH ₂ (ppm)	CH / CH ₂ (ppm)	CH / CH ₂ (ppm)
Co-ASS	2.52 / 4.86	6.11 / 5.47	3.59 / 0.61
Co-SAL	2.55 / 4.95	6.16 / 5.56	3.61 / 0.61
Co-Indo	2.47 / 4.71	5.92 / 5.33	3.45 / 0.62
Co-ASSAM	2.29 / 4.23	6.10 / 4.78	3.81 / 0.55
Co-Phthal	2.23 / 4.46	6.08 / 5.04	3.85 / 0.58

Tabelle 6.1: Verschiebung von Methin- und Methylenprotonen in ¹H-NMR-Spektren bei der Komplexbildungsreaktion

6.4 Hochdruckflüssigchromatographie

Die Hochdruckflüssigchromatographie ('High Performance Liquid Chromatography' = HPLC) wurde zur Reinheits- und Identitätsprüfung (sofern Zielprodukte bereits vorhanden waren), Stabilitätsuntersuchungen (siehe Abschnitt 8) und Bestimmung Lipophilie (siehe Abschnitt 7) eingesetzt. Die Komplexe wurden isokratisch mit 20% H₂O/80% MeOH) von einer RP-18-Säule eluiert und mit einem Diodenarraydetektor erfasst. Die genauen Methodenparameter finden sich in Abschnitt 17.4 (Lipophiliebestimmung).

6.5 Atomabsorptionsspektroskopie

Bei der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) handelt es sich um ein Verfahren bei dem - wie der Name schon sagt - die Lichtabsorption von Atomen gemessen wird. Generell wird das Verfahren für die Quantifizierung kleinster Mengen an Metallen verwendet. Die Atome werden durch hohe Energiezufuhr aus den zu untersuchenden Verbindungen erzeugt. Dabei werden vorhandene Bindungen homolytisch gespalten und die Metallatome so in den atomaren, gasförmigen Zustand gebracht. Die freien Atome absorbieren sodann von einer Hohlkathodenlampe ausgesandte Resonanzlinien. Da nach dem Kirchhoffschen Strahlungsgesetz ein Körper nur diejenige Strahlung absorbiert, die er bei einer Anregung auch emittiert, muss folglich die Kathode der Hohlkathodenlampe mit dem zu untersuchenden Element beschichtet sein. Denn nur dann können von der Hohlkathodenlampe genau die 'richtigen' Linien emittiert werden. Diese Form der Absorption wird auch als Resonanzabsorption bezeichnet und die dabei absorbierten Linien - wie eben schon erwähnt - Resonanzlinien. Die sich dadurch ergebende Elementselektivität dieses Verfahrens ist, neben den äusserst geringen Nachweisgrenzen, einer der großen

Vorteile der Atomabsorptionsspektroskopie. Zur Atomisierung werden im wesentlichen folgende vier Techniken eingesetzt:

- Flammentechnik
- Graphitrohrtechnik
- Hydrid-Technik
- Kaltdampftechnik

Bei der Flammentechnik werden die Atome durch Verbrennen der Probe in einer Flamme erzeugt. Die Flamme wird meist mit Acetylen/Luft oder Acetylen/Lachgas-Gemischen betrieben. Mit dieser Technik können Nachweisgrenzen unter 1ppm erreicht werden. Die Graphitrohrtechnik liefert noch um den Faktor 2-3 niedrigere Nachweisgrenzen. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Substanzen elektrothermisch in einem Graphitrohr verbrannt. Neben der Flammentechnik ist dies die am weitesten verbreitete AAS-Atomisierungstechnik. Weniger bedeutend sind die Hydrid- und die Kaltdampftechnik. Diese Verfahren zeichnen sich zwar durch noch niedrigere Nachweisgrenzen aus, können aber jeweils nur bei wenigen Elementen angewandt werden. Bei der Hydridtechnik werden die Metalle vor der Atomisierung zu Hydriden reduziert, welche leichter atomisierbar sind. Dieses Konzept ist aber eben nur auf wenige (reduzierbare) Metalle anwendbar (z.B. Arsen, Selen etc.). Die Kaltdampftechnik beruht auf der Tatsache, dass Quecksilber einen vergleichsweise hohen Dampfdruck aufweist und somit schon bei relativ milden Bedingungen atomisierbar ist. Diese Technik ist nur für Quecksilber anwendbar.[79]

Cobalt-Analytik mit Graphitrohr-AAS

Zur quantitativen Bestimmung des Cobalt-Gehaltes wurde die Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie angewandt. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Substanzen in ein elektrisch beheizbares Graphitrohr injiziert. Dieses wird anschließend schrittweise aufgeheizt. Der Ablauf der einzelnen Aufheizphasen ist bei dieser Technik ein entscheidender Parameter in der Methodenentwicklung. Vor der eigentlichen Atomisierung werden in die Gasphase überführte Probenbestandteile durch einen Argon-Inertgasstrom aus dem Rohr abgezogen. Diese Matrixvorbehandlung erlaubt eine weitgehend störungsfreie Analytik. Die einzelnen Phasen der Probenvorbehandlung werden in sogenannten 'Temperatur-Zeit-Programmen' (oder 'Ofenprogrammen', siehe Abbildung 6.3) wiedergegeben und bestehen im wesentlichen aus:

- Trocknen und Mineralisieren
(Entfernung des Lösungsmittels, thermische Vorbehandlung)
- Pyrolyse
(vollständige Verbrennung organischer Probenbestandteile)
- Atomisierung / Messung
(Erfassung der Absorption der nun in gasförmigen Zustand frei vorliegenden Cobalt-Atome. Während dieser Phase wird der Inertgasstrom gestoppt.)
- Ausheizen / Abkühlen
(Dieser Schritt dient der Reinigung des Graphitrohres. Jegliches Probenmaterial wird nun aus dem Rohr entfernt. Nach einer Abkühlphase kann das Graphitrohr ohne weitere Behandlung für die nächste Bestimmung eingesetzt werden.)

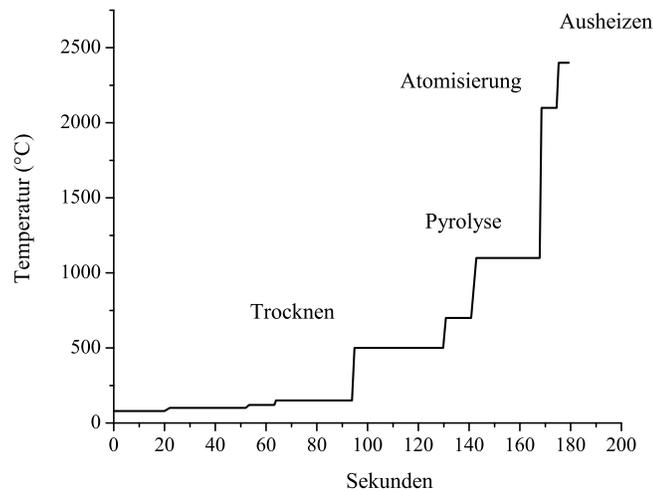


Abbildung 6.3: Ofenprogramm für Graphitrohr-AAS

Direkt vor der eigentlichen Messung während der Atomisierungsphase wird mit einer Deuteriumlampe die Absorption 'neben' der eigentlichen Resonanzlinie bestimmt und anschließend vom eigentlichen Messsignal subtrahiert. Bei der Deuteriumlampe handelt es sich nicht wie bei der Hohlkathodenlampe um einen elementspezifischen Linienstrahler, sondern um einen

Kontinuumstrahler. Somit werden sämtliche nicht durch Cobalt-Atome verursachten Absorptionen erfasst und ermöglichen diese Form der Untergrundkorrektur.

Entwicklung eines Ofenprogrammes

Die ersten Phasen des Ofenprogrammes (Dauer und Temperatur der Trocknungs- und Mineralisierungsschritte) für die Cobalt-Alkin-Komplexe wurden hinsichtlich minimaler Untergrundabsorption in der nachfolgenden Messphase empirisch und in Anlehnung an eine bestehende Methode ermittelt [80].

Zur Ermittlung geeigneter Bedingungen für die Pyrolyse- und Atomisie-

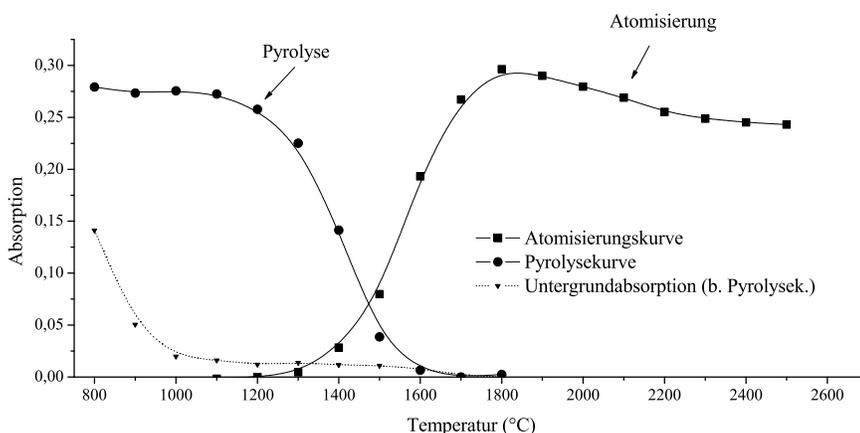


Abbildung 6.4: Wahl geeigneter Pyrolyse- und Atomisierungstemperatur; Probe: Co-ASS $1.0\mu\text{M}$ in Zellkulturmedium (+10% FCS, 0.1% DMF) stabilisiert mit je 10% Triton-1% und HNO_3 -13%.

zungsschritte wurde auf das von Welz vorgeschlagene Verfahren zurückgegriffen [79]. Dabei wird zunächst bei konstanter Atomisierungstemperatur jeweils die Pyrolysetemperatur schrittweise verändert und die Atomabsorption durch die Hohlkathodenlampe sowie die Untergrundabsorption durch die Deuteriumlampe registriert. Diejenige Pyrolysetemperatur, die möglichst verlustfreies Arbeiten mit geringer Untergrundabsorption erlaubt, wird für die weiteren Versuche beibehalten. Bei zu hoher Pyrolysetemperatur können aufgrund zu früh einsetzender Atomisierung zu niedrige Messergebnisse registriert werden. Bei zu niedriger Pyrolysetemperatur können nicht entfernte Matrixkomponenten in der nachfolgenden Messphase

zu hohen Untergrundabsorptionen (unspezifische Absorptionen) führen. Im zweiten Schritt wird bei konstanten Pyrolysebedingungen immer nur die Atomisierungstemperatur variiert. Bei zu niedrigen Atomisierungstemperaturen wird nicht der gesamte Analyt atomisiert, während bei zu hohen Temperaturen bereits einsetzende Ionisierung der Atome (Bildung von Kationen durch Verlust von Elektronen aus der Valenzschale) und Probenverluste durch das Eingabeloch des Graphitrohrs (Ausdehnung der Atomgaswolke) ebenfalls zu niedrigeren Absorptionen führen. Die Pyrolyse- und Atomisierungskurven für Cobalt-Alkin-Komplexe sind in Abbildung 6.4 (exemplarisch für Co-ASS in Zellkulturmedium) dargestellt. Bei der Pyrolysekurve ist ein Absinken der Messwerte ab Temperaturen von über 1200°C zu sehen. Messdaten der Deuteriumlampe machen deutlich, dass unterhalb von 1000°C Pyrolysetemperatur hohe Untergrundabsorption stattfindet. Folglich wurde die Pyrolysetemperatur auf 1100°C festgelegt. Die Atomisierungskurve zeigt ein Absorptionsmaximum bei 1800°C, gefolgt von einem leichten Absinken der Werte. Bei den weiteren Messungen die Atomisierung bei 2100°C durchgeführt.

Wahl der geeigneten Resonanzlinie / Verwendung stabilisierender Probenzusätze / Signalreproduzierbarkeit und Auswertung / charakteristische Konzentration

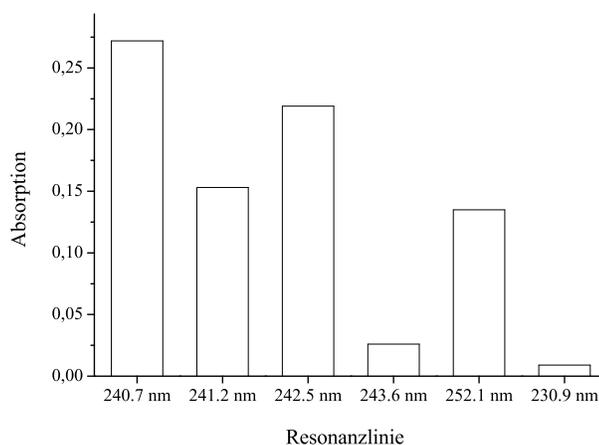


Abbildung 6.5: Wahl der geeigneten Resonanzlinie; Probe: 1.0µM Co-ASS in Zellkulturmedium (+10% FCS, 0.1% DMF) stabilisiert mit je 10% Triton-1% und HNO₃-13%.

Zur Cobalt-Analytik durch AAS wird meist die Resonanzlinie bei 240.7nm

herangezogen. Abbildung 6.5 zeigt die Absorptionen bei 240.7nm und anderen weniger intensiven Linien. Bezüglich der Auswahl der untersuchten Linien sei auf die Literatur sowie die 'NIST Atomic Spectra Database' verwiesen [79]-[81]. Erwartungsgemäß wurden bei 240.7nm die besten Ergebnisse erzielt. Die Untergrundabsorptionen waren bei allen Linien vergleichbar gering (nicht gezeigt).

Bei längerer Lagerung schwermetallhaltiger Proben kann es zu Verlusten durch Adsorption an Gefäßwänden kommen. Um diese möglichst gering zu halten, sollten Probenbehältnisse aus Polyethylen verwendet und Glasgefäße soweit möglich vermieden werden. Weiterhin wirkt sich die Lagerung unter sauren Bedingungen positiv auf die Stabilität aus [79]. Die AAS-Proben wurden deshalb unter Zusatz von 10 Volumsprozent 13%iger HNO₃ in PE-Autosamplerprobengefäßen oder Eppendorf-Reagiergefäßen im Kühlschrank bei 4-5°C gelagert. Zur Stabilisierung meist vorhandener Protein- oder DNS-Komponenten wurden zusätzlich 10 Volumsprozent Triton-1% zugegeben.

Die Signalreproduzierbarkeit der Methode wurde durch neunfach wiederholte Injektion einer 1.0µM Probe von Co-ASS bestimmt. Bei Auswertung der Signale über die Fläche wurde eine RSD von 1.021% bestimmt und bei Auswertung über die Höhe eine RSD von 0.724%. Somit sind beide Verfahren gewissermaßen gleich gut geeignet. Bei den weiteren Versuchen wurden die Absorptionsdaten stets durch Verwendung der Signalfächen nach dem Eichgeradenverfahren ausgewertet. Die Linearität von (wie eben beschrieben stabilisierten) Kalibrierlösungen verschiedensten Ursprungs (siehe z.B. Zellaufnahme und DNS-Bindung) war in Konzentrationen bis zu 1.0µM mit r² meist > 0.999 gewährleistet. Die einzelnen Messdaten wurden jeweils durch Berechnung des Mittelwertes aus zwei aufeinanderfolgenden Messungen gebildet. Die Empfindlichkeit wird bei der AAS-Analytik als charakteristische Konzentration angegeben. Diese entspricht derjenigen Konzentration, die ein Messsignal von mindestens 0.004 hervorruft [79]. Sie beträgt für die neu entwickelte Methode 0.006µM. Die Kenndaten der Methode sind in Tabelle 6.2 nochmals zusammengestellt, die genauen Geräteeinstellungen und das detaillierte Ofenprogramm sind in Abschnitt 17.3 zu finden.

Linearitätsbereich	0.1-1.0µM
Reproduzierbarkeit (Signalfäche)	1.021% RSD
Reproduzierbarkeit (Signalhöhe)	0.724% RSD
charakteristische Konzentration	0.006µM

Tabelle 6.2: Kenndaten für die AAS-Methode

